4. 検体に接触した器具を滅菌する場合は、次のいずれかの方法で処理してください。
・0.05%ホルマリン溶液に37°C、72時間以上浸す。
・2%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸す。
・次亜塩素酸ナトリウムを0.1%以上含む溶液に1時間以上浸す。
・121°Cで少なくとも1時間以上オートクレーブにかける。
5. 検体、廃液等が飛散した場合は、2%グルタルアルデヒド溶液、次亜塩素酸ナトリウムを0.1%以上含む溶液等によりふき取りと消毒を行ってください。

その他の注意
1. 定期的な精度管理を実施してください。
2. 試薬の容器等は他の目的に転用しないでください。

【貯蔵方法・有効期間】
1. 貯蔵方法
HISCL 洗浄液：　2〜30°Cで保存
上記以外の構成試薬：　2〜8°Cで保存
2. 有効期間
12カ月（使用期限は、外箱に表示しています。）

＊【包装単位】

製商品名	構成試薬名	包装
HISCL M2BPGi 試薬	HISCL M2BPGi R1 試薬※11	5mL×1
	HISCL M2BPGi R2 試薬	3mL×1
	HISCL M2BPGi R3 試薬※11	10mL×1
HISCL M2BPGi キャリブレータ※12	HISCL M2BPGi NC	1mL×1
	HISCL M2BPGi PC	1mL×1
HISCL 発光基質セット※12	HISCL R4 試薬	40mL×1
	HISCL R5 試薬	70mL×1
HISCL 洗浄液※12	HISCL 洗浄液	10L×1

※11：R1 試薬とR3 試薬は一体型の容器で提供されます。
※12：これらの製品は別売品となります。

製品には別容量の包装があります。弊社までお問い合わせください。

【主要文献】

(1) Kurokawa T, et al:Purification and characterization of a lectin from Wistaria floribunda seeds., J Biol Chem. **251(18)**, 5686-93 (1976)
(2) Piller V,et al:Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins., Eur J Biochem. **191(2)**, 461-6(1990)
(3) Ozaki Y, et al:Expression and immunogenicity of a tumor-associated antigen, 90K/Mac-2 binding protein, in lung carcinoma., Cancer. **95(9)**, 1954-62(2002)
(4) Sun W, et al : N-glycans of human protein C inhibitor: tissue-specific expression and function., PLoS One. **6(12)**, e29011 (2011)
(5) Comelli EM, et al : A focused microarray approach to functional glycomics: transcriptional regulation of the glycome., Glycobiology. **16(2)**, 117-31(2006)
(6) Kuno A, et al: A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis., Sci. Rep. **3**,1065-73(2013)
(7) Ahmad W et al : A brif review on molecular,genetic and imaging techniques for HCV fibrosis evaluation., Virology Journal, **8**, 53 (2011)
＊(8) Abe M et al: Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease., J Gastroenterol. (2014)
＊(9) Yamasaki K et al: Elevated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients., Hepatology., **60(5)**,1563-70,(2014)
＊(10)Tamaki N et al: Wisteria floribunda agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients., Hepatol Res. (2015)

【問合せ先】

シスメックス株式会社 CSセンター
〒651-2241 神戸市西区室谷1丁目3番地の2
TEL 0120-413-034

＊

REF　カタログ番号
使用期限
IVD　体外診断用の専用製品
LOT　ロット番号
製造販売元
Σ　テスト数
添付文書参照
保存温度

製造販売元
シスメックス株式会社
神戸市中央区脇浜海岸通 1-5-1　〒651-0073
TEL(078)265-0500(代)

＊ 2015年 4月 改訂（第2版）
2013年 12月 作成（第1版）

この添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

製造販売承認番号 22500AMX01930000

Mac-2結合蛋白(M2BP)糖鎖修飾異性体キット

HISCL® M2BPGi 試薬

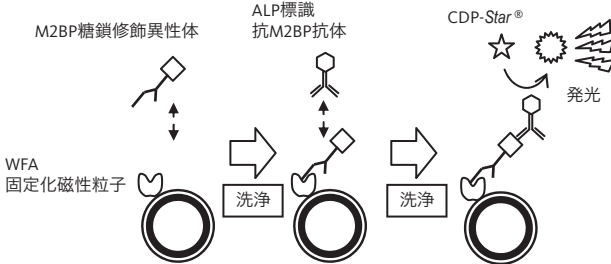
【全般的な注意】
1. 本品は体外診断用医薬品です。これ以外の目的に使用しないでください。
2. 添付文書以外の使用方法については保証をいたしかねます。
3. 測定に使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用してください。
4. 診断の際には、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。

【形状・構造等（キットの構成）】
本キットは、次の試薬により構成されています。
1. HISCL M2BPGi試薬
(1) HISCL M2BPGi R1試薬　（以下、R1試薬）
(2)HISCL M2BPGi R2試薬　（以下、R2試薬）
WFA固定化磁性粒子
(3)HISCL M2BPGi R3試薬　（以下、R3試薬）
ALP標識抗M2BPモノクローナル抗体（マウス）
2. HISCL 発光基質セット
(1) HISCL R4試薬　（以下、R4試薬）
(2)HISCL R5試薬　（以下、R5試薬）
CDP-*Star* ®
3. HISCL 洗浄液　（以下、洗浄液）
4. HISCL M2BPGiキャリブレータ　（以下、キャリブレータ）
(1) HISCL M2BPGi NC
(2)HISCL M2BPGi PC

M2BP：Mac-2 Binding Protein
WFA：*Wisteria floribunda* lectin
ALP：アルカリホスファターゼ
CDP-*Star* ®：Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate

【使用目的】
血清中のMac-2 Binding Protein (M2BP)糖鎖修飾異性体の測定
（肝臓の線維化進展の診断の補助）

【測定原理】
本法は2ステップサンドイッチ法を用いた化学発光酵素免疫測定法です。
1. R1試薬によって試料を希釈する。
2. 試料中のM2BP糖鎖修飾異性体とR2試薬中のWFA固定化磁性粒子が特異的に反応します。
3. 未反応液を除去後、R3試薬を添加すると、ALP標識抗M2BPモノクローナル抗体（マウス）が磁性粒子上のM2BPと特異的に反応します。
4. 未反応液を除去後、R4試薬及びR5試薬を添加すると、発光基質CDP-*Star* ®が磁性粒子上のALPにより分解され、生じた発光の強度を測定します。

試料中のM2BP糖鎖修飾異性体（WFA反応性M2BP）量に応じて発光強度が増加しますので、あらかじめ一定量のM2BP糖鎖修飾異性体を含む試料（HISCL M2BPGi PC）を測定し、その発光強度からカットオフ値を設定しておくことにより、試料中のM2BP糖鎖修飾異性体を測定することができます。

【操作上の注意】
測定試料の性質, 採取法
1. 検体は採取後、できるだけ速やかに測定してください。
2. 検体の保存が必要な場合は、-20°C以下で凍結して保存してください。ただし凍結融解を繰り返すことは避けてください。
3. 血清は溶血しないように採取してください。
4. 冷蔵又は冷凍保存されていた検体を使用する場合は室温に戻してください。

妨害物質・妨害薬剤
1. フィブリン塊等の固形物が見られる検体は、2,000×gで10分間以上遠心分離し、固形物を除去してから測定してください。
2. 濁りのある検体、溶血が見られる検体は、正しく測定が行えない恐れがあります。
3. ヘモグロビン（500 mg/dL以下）、ビリルビン（ビリルビンF；18.5 mg/dL以下、ビリルビンC；20.2 mg/dL以下）、乳ビ（1,560ホルマジン濁度数以下）及びRF（550 IU/mL 以下）は、記載の濃度では判定に影響を与えません。

その他
1. 本品は「全自動免疫測定装置HISCL-2000 *i*」（シスメックス株式会社）又は同等品の専用試薬であり、他の装置には使用できません。
2. 必ず本添付文書で指定された試薬（R1〜R5試薬・キャリブレータ・洗浄液等）を使用してください。
3. R1〜R3試薬容器は、後述の測定（操作）法に従って正しく組み立ててから使用してください。組立が不完全な場合、装置のエラーや試薬の蒸発が起こり、正しく測定が行えない恐れがあります。
4. R4試薬、R5試薬を装置にセットする際には、体液中に広く含まれるアルカリホスファターゼの混入を防ぐため、手指の接触や唾液の飛散等に注意して取り扱ってください。またR5試薬はアルカリ性であり、空気中の二酸化炭素によるpH変動を避けるため、セット後は交換時まで取り外さないでください。
5. 試料をサンプルカップ等に分注する場合は、蒸発の影響を考慮して200μL以上分注してください。なお、最低分注量については、装置の取扱説明書をご覧ください。

【用法・用量（操作方法）】
試薬の調製方法
本キットの各構成試薬は調製済みですので、そのまま使用してください。

必要な器具・器材・試料等
・HISCL-2000*i* または同等品
・消耗品
反応キュベット、チップ等

測定（操作）法
1. 準備
(1) R2試薬容器を取り出し、気泡が生じないようゆるやかに手振りかくはんし、磁性粒子が分散されたことを目視で確認してください（転倒混和は避けてください）。

(2)初回のみ、試薬容器前部の爪を押しながら容器ケースを完全に押し下げてください（アルミシールが破れて開栓されます）。

(3)使用する装置の取扱説明書に従い、試薬容器を装置にセットしてください。

2. 標準操作法
 (1) 反応キュベットにR1試薬50μLと試料10μLを分注し、42°Cで2分間反応させます。
 (2)R2試薬30μLを分注し、42°Cで1分間反応させます。
 (3)洗浄液100〜700μLの分注と磁気分離を組み合わせ洗浄します。この操作を4回行います。
 (4)R3試薬100μLを分注し、42°Cで2.5分間反応させた後、磁気分離（反応キュベットに磁石を近づけ、液体部分を吸引除去）します。
 (5)洗浄液100〜700μLの分注と磁気分離を組み合わせ洗浄します。この操作を4回行います。
 (6)R4試薬50μLを分注して混合かくはんした後、R5試薬100μLを分注して混合かくはんし、42°Cで5分間反応させ、波長300〜650nmの範囲の発光強度を測定します。
3. カットオフ値の設定
 (1) 各キャリブレータを泡立たないように静かにかくはんし、使用する装置の取扱説明書に従ってセットします。
 (2)2.標準操作法 に準じて測定を行い、発光強度を測定します。
 (3)HISCL M2BPGi PCの発光強度をカットオフ値とします。※1
 （HISCL M2BPGi NCの発光強度は、4. 検体の測定において、カットオフインデックスを求める時に使用します。）
 カットオフ値 ＝HISCL M2BPGi PCの発光強度
4. 検体の測定
 (1) 使用する装置の取扱説明書に従って検体をセットします。
 (2)2.標準操作法 に準じて測定を行い、発光強度を測定します。
 (3)発光強度を下記の計算式に当てはめ、検体のカットオフインデックスを求めます。※1

 カットオフインデックス＝
 （検体の発光強度 － HISCL M2BPGi NCの発光強度）/
 （カットオフ値 － HISCL M2BPGi NCの発光強度）

※1: 装置ではこれらの操作を自動で行います。

【測定結果の判定法】

判定法

カットオフインデックスが、1.00未満を示す検体は、陰性(-)と判定します。
カットオフインデックスが、1.00以上3.00未満を示す検体は、陽性(1+)と判定します。
カットオフインデックスが、3.00以上を示す検体は、陽性(2+)と判定します。

＊ **判定上の注意**

1. 多施設共同臨床性能試験結果から本キットは、M2BP糖鎖修飾異性体量により非慢性肝炎(-)、慢性肝炎(1+)、肝硬変(2+)を群別する試薬です。本キットの結果は生検検査にて判定した肝臓の線維化ステージと良い一致率を示しますが、まれに両者で異なる結果を示すことがありますので、測定結果に基づく診断は他の関連検査及び臨床症状等により総合的に判断してください。
2. 他の臓器線維症での検討はされていませんので、測定結果に基づく診断は他の関連検査及び臨床症状等により総合的に判断してください。
3. 免疫反応においては、一般的に非特異反応により陽性または陰性の判定となる場合があることが知られていますので、測定結果に基づく診断は他の関連検査及び臨床症状等により総合的に判断してください。非特異反応の原因としては、各種の自己抗体、不溶物（特にフィブリン）、自然抗体などが考えられます。
4. 一部のがん患者由来の検体においては、陽性になることが確認されています。がん患者由来の検体においては、陽性判定になる可能性がありますので測定結果に基づく診断は他の関連検査及び臨床症状等により総合的に判断してください。
5. ネフローゼ症候群を合併症とした症例では、陽性判定になる可能性がありますので測定結果に基づく診断は他の関連検査及び臨床症状等により総合的に判断してください。

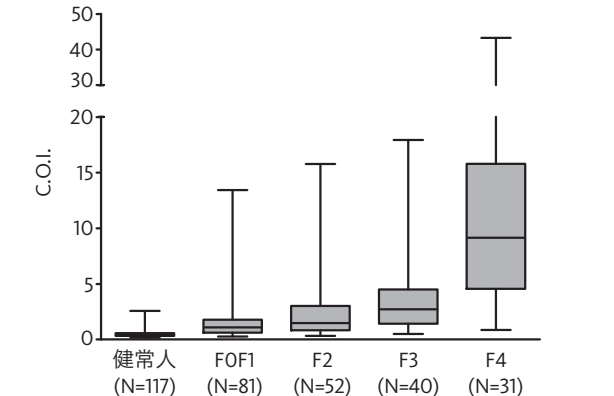
【臨床的意義】

本キットで用いているレクチン（*Wisteria floribunda* lectin：以下WFA）は、Kurokawa らによって発見されたレクチンであり、Piller らによってα/β-N-アセチルガラクトサミンとの結合が報告されています(1,2)。またターゲットのコアタンパク質であるM2BPは、Macrophage-associated lectin である Mac-2 のリガンドとして知られている分泌性糖タンパク質であり、585残基のアミノ酸より構成され、1次配列上7箇所のN結合型の糖鎖付加部位が知られており、さらに生体内では8-12量体のリング状構造で存在しているため1分子あたりの糖鎖量が多く、WFAと多点結合が可能となり強い親和性を示すことが考えられます。
またM2BPは、健常者の血清中では数μg/mLのオーダーで発現しており、線維化や癌化により発現の亢進が報告されていますが、その増加量は個人差のばらつき範囲と重複しているため、M2BPのタンパク質発現レベルの測定のみでは臨床診断上の有用性は低いと考えられます(3)。一方、糖鎖を合成する糖転移酵素のセットが臓器により異なるため、糖タンパク質の糖鎖構造には臓器特異性が報告されており、さらに疾患や細胞の癌化により正常細胞と比較して、その細胞表面の糖鎖構造が変化するということはよく知られています(4,5)。さらにM2BPの糖鎖構造が肝臓の線維化進展により顕著に変化することが報告されており、特にWFAが認識するM2BPの糖鎖構造変化の測定は肝臓の線維化病態の把握に有用であり、線維化ステージを反映する糖鎖マーカーであることが明らかにされています(6)。
このように疾患特異的に変化する糖鎖修飾異性体を捕捉するWFAとそのM2BP本体を認識する抗体を組み合わせた測定系は、タンパク質の量的な変化だけを指標とするのではなく、組織特異的な糖タンパク質上の病態変化に伴う糖鎖構造変化も指標とするため、WFA認識糖鎖構造を有する血清中のM2BP糖鎖修飾異性体を測定することは、肝臓の線維化進展の診断補助として臨床診断上有用であることが示されました。
＜臨床成績＞
1. 肝生検検査との一致率
 多施設共同臨床研究において、肝生検検査で肝臓の線維化ステージが決定している患者由来の血清を用いて、生検結果と本キットによる判定結果を比較致しました（盲検化試験）。
 (1)判定した肝臓の線維化ステージF0F1判定以上と本キットとの判定一致率を評価致しました。

N=321		慢性肝炎患者	健常人※4
		肝生検による判定 (≧F0F1)	
M2BPGi	陽性※2	150	3
	陰性※3	54	114

 ※2: 陽性：C.O.I.で1.00以上の検体（1+および2+）
 ※3: 陰性：C.O.I.で1.00未満の検体
 ※4: 生検検査は未実施
  一致率：0.822 [264/321 ；95%信頼区間 0.776-0.863]
  感度 ：0.735 [150/204 ；95%信頼区間 0.669-0.794]
  特異度：0.974 [114/117 ；95%信頼区間 0.927-0.995]
 なお、判定が異なった検体については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。健常人群でM2BPGi陽性（1+）となった3例は、本キットのカットオフ設定時の条件が健常人血清の平均値＋2.5SDのため妥当なものと考えられました。なお、慢性肝炎患者でM2BPGi陰性(-)となった54検体中の45検体が、線維化のステージと他の線維化指標であるヒアルロン酸（HA）またはFIB-4の判定結果から、肝線維化の程度が低い事が、不一致の原因と考えられました。しかしながら、残り9検体については、原因を推察する事は出来ませんでした。
 (2)肝生検検査で判定した肝臓の線維化ステージF4判定と本キットとの判定一致率を評価致しました。

N=321		肝硬変患者	肝硬変患者以外※5
		肝生検による判定 (F4)	肝生検による判定 (≦F3)
M2BPGi	陽性(2+)※6	25	40
	陽性(1+)※7 及び陰性	6	250

 ※5: 健常人から得られた検体はF3以下（≦F3）に含まれる。
 ※6: 陽性(2+) ：C.O.I.が3.00以上の検体
 ※7: 陽性(1+) ：C.O.I.が1.00以上3.00未満の検体
  一致率※8 ：0.857 [275/321 ；95%信頼区間 0.814-0.893]
  感度※8 ：0.806 [25/31 ；95%信頼区間 0.625-0.925]
  特異度※8 ：0.862 [250/290 ；95%信頼区間 0.817-0.900]
 ※8: 肝生検検査によって線維化ステージF3またはF4と判定された71検体（F3：40検体、F4：31検体）での本キットによる判定と肝生検によるF4判定に対する一致率、感度及び特異度は、それぞれ0.676(48/71)、0.806（25/31）、0.575（23/40）でした。
 なお、判定が異なった検体については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。肝硬変患者以外でM2BPGi陽性（2+）となった40 検体の内31検体は、HAまたはFIB-4による判定から肝線維化の程度が高い可能性が示されましたが、残り9検体については原因を推察する事は出来ませんでした。また、肝硬変患者例でM2BPGi陽性（2+）と判定されなかった検体は6検体存在しましたが、その内5検体はM2BPGiで陽性判定（1+）であり、残り1検体も他の線維化指標であるHAでは陰性であることから、生検のサンプリング部位による判定誤差も考えられましたが、明らかな原因を特定することはできませんでした。(1)および(2)の解析結果は、Ahmadらの報告に用いられている既存の肝線維化指標に優るとも劣らない結果であることが示されました(7)。
2. 肝臓の線維化ステージとC.O.I.との関係
 (1)肝生検検査で判定した肝臓の線維化ステージ判定と本キットのC.O.I.との関係を箱ヒゲ図にて示しました。

 箱ひげ図は、最大値、第3四分位、中央値、第1四分位、最小値を示す。

 Wilcoxon Rank Sum Test

P< 0.001 (健常人 vs F0F1)	P< 0.001 (健常人 vs F2)
P< 0.001 (健常人 vs F3)	P< 0.001 (健常人 vs F4)
p= 0.026 (F0F1 vs F2)	P< 0.001 (F0F1 vs F3)
P< 0.001 (F0F1 vs F4)	p= 0.009 (F2 vs F3)
P< 0.001 (F2 vs F4)	P< 0.001 (F3 vs F4)
Analysis of Variance (ANOVA)	P< 0.001

 肝線維化の状態別（健常人、並びに肝線維化ステージF0F1〜F4）に本キットの測定結果（C.O.I.）を箱ヒゲ図にて比較した結果、C.O.I.は健常人では低値であり、肝線維化ステージの上昇の程度に伴い有意に高値になることが示されました。

【性能】

性能

1. 感度
 HISCL M2BPGi NC およびHISCL M2BPGi PCをそれぞれ5回測定し、各々の発光強度カウント※9の平均値と標準偏差をX_{NC}、SD_{NC}およびX_{PC}、SD_{PC}とするとき$(X_{NC}+2SD_{NC})<(X_{PC}-2SD_{PC})$である。
2. 正確性
 (1) M2BPGi陰性管理用試料※10を試料として測定するとき、陰性と判定される。
 (2)M2BPGi陽性管理用試料※10を試料として測定するとき、測定値はその管理値の±30%の範囲にある。
3. 同時再現性
 (1) M2BPGi陰性管理用試料※10を試料として10回測定するとき、すべて陰性と判定される。
 (2)M2BPGi陽性管理用試料※10を試料として10回測定するとき、測定値のCVは15%以下である。
4. 測定範囲
 カットオフインデックスが0.10〜20.00

※9: カウント：HISCL専用装置の発光強度の単位
※10: 管理用物質：
 ここで用いるM2BPGi陰性管理用試料は、M2BP糖鎖修飾異性体陰性であるヒト血清である。また、M2BPGi陽性管理用試料は、M2BP糖鎖修飾異性体陰性であるヒト血清にM2BP糖鎖修飾異性体陽性ヒト血清またはリコンビナントM2BP抗原を一定のC.O.I.となるように添加して調製したものである。
 M2BPGi陰性管理用試料（C.O.I.：0.60以下）
 M2BPGi陽性管理用試料（C.O.I.：2.70〜3.30）
 注）C.O.I.：カットオフインデックスの略である。

較正用基準物質に関する情報

陰性検体と陽性検体の測定分布から設定したカットオフ値を示すようにリコンビナントM2BP抗原を用いて社内一次標準品を作成し、これを較正用基準物質としています。

【使用上又は取扱い上の注意】

取扱い上（危険防止）の注意

1. R1〜R3試薬、R4試薬及びキャリブレータには、アジ化ナトリウムが含有されていますが、法的には毒物として取り扱われません。また、R5試薬はアルカリ性（pH9.6）です。
 これらの試薬が誤って目や口に入ったり皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
2. 検体はHBV, HCV, HIV等による感染の恐れがあるものとして、取扱いには厳重な注意をしてください。
3. 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋等を着用してください。
4. 感染を避けるために口によるピペッティングを行わないでください。

使用上の注意

1. 各試薬は、気泡が生じないように、ていねいに扱ってください。気泡が生じると、測定が正常に行われないことがあります。この場合には、気泡が消えるのを待ってからご使用ください。
2. Lot No.が異なるR1〜R3試薬を組み合わせて使用しないでください。また、Lot No.が同じであっても試薬をつぎ足して使用しないでください。使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
3. R1〜R3試薬を装置から取り出した場合は2〜8°Cで保存してください。装置に戻す場合はR2試薬容器を【用法・用量（操作方法）】に従ってかくはんしてからセットしてください。誤って凍結させた試薬は品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。開封後の有効期間は30日です。
4. 各キャリブレータは必要量を分注した後、速やかにふたをして2〜8°Cで保存してください。放置したままですと蒸発等の影響で濃度変化が起こり、キャリブレーションが正常に行えなくなります。
5. キャリブレーションの有効期間は作成から30日です。ただし期間内でも、以下の場合には作成し直してください。
 ・新しいLot No.のR1〜R3試薬を使用する場合
 ・精度管理で異常が生じた場合
 ・装置の取扱説明書に記載されている特定のメンテナンス・修理を実施した場合

廃棄上の注意

1. アジ化ナトリウムは、鉛、銅などと反応して爆発性の化合物を生成する危険性がありますので、廃棄の際には、大量の水と共に流してください。
2. 廃棄にあたっては水質汚濁防止法等の規制及び各都道府県の条例等に留意して処理してください。
3. 使用後の容器は、焼却処理するか、廃棄する場合には廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等区別して処理してください。